

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 753 722**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **96 11725**

⑤1 Int Cl⁶ : C 12 Q 1/42

⑫ **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②2 Date de dépôt : 26.09.96.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 27.03.98 Bulletin 98/13.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : SMITHKLINE BEECHAM
LABORATOIRES PHARMACEUTIQUES — FR.

⑦2 Inventeur(s) : BERTRAND BERREBI ISABELLE et
BRIL ANTOINE MICHEL ALAIN.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : CABINET ORES.

⑤4 PROCÉDE DE DETECTION DE MODULATEURS DE RELAXATION CARDIAQUE ET MODULATEURS AINSI
OBTENUS.

⑤7 La présente invention est relative à un procédé de dé-
tection de modulateurs de la relaxation cardiaque et aux
modulateurs ainsi obtenus.

Ce procédé se caractérise en ce que l'on inclut l'effet
modulateur d'une molécule potentielle, sur la phosphoryla-
tion du phospholamban (PLB).

FR 2 753 722 - A1



La présente invention est relative à un nouveau procédé de "criblage" dont le but est l'identification de nouvelles molécules à visée thérapeutique.

5 A l'échelon cellulaire et moléculaire la relaxation cardiaque dépend de la fonction d'enzymes spécifiques telles que la Ca^{2+} ATPase du réticulum sarcoplasmique (RS) qui sont localisées dans le réticulum sarcoplasmique. La RS- Ca^{2+} ATPase cardiaque joue le rôle
10 de pompe permettant le stockage des ions Ca^{2+} dans le réservoir intracellulaire que constitue le RS.

Il est largement décrit que cette pompe cardiaque est régulée par une phosphoprotéine appelée Phospholamban (PLB). Le PLB existe sous deux formes
15 particulières : phosphorylée (PPLB) et déphosphorylée. C'est sous sa forme déphosphorylée que le PLB exerce son action inhibitrice à l'égard de la RS- Ca^{2+} ATPase cardiaque, ceci en diminuant son affinité pour le Ca^{2+} . Cet effet inhibiteur est supprimé quand le PLB est sous
20 sa forme phosphorylée (PPLB); ce qui a pour conséquence de favoriser la relaxation cardiaque.

Le PLB est phosphorylé par des protéines kinases et déphosphorylé par des protéines phosphatases (PLB-PP)

25 La présente invention est plus particulièrement relative au passage de l'état PPLB vers l'état PLB et plus particulièrement elle est relative à des composés susceptibles d'inhiber la déphosphorylation du PLB donc des composés inhibant l'activité et la
30 fonction des PLB-PP.

La PLB-PP associée au RS cardiaque est une enzyme de type-1 couramment appelée PP1. Son activité catalytique est contrôlée par une sous-unité de 37 kilodaltons (kDa) décrite sous le nom de PP1Csub.

35 Des données très récentes ont mis en évidence l'existence d'une nouvelle classe de protéines appelées

"targeting subunits" ou PP1-Tsub de 124 kDa . Chacune de ces PP1-Tsub est liée à une sous-unité catalytique de PP1 assurant la liaison de celle-ci au niveau d'une région bien spécifique du RS. Dans le coeur, l'hétérodimère
5 formé par PP1-Csub+PP1-Tsub est appelé PP1G et représente la SR-PP majoritaire.

Il est très probable que la liaison de la PP1-Tsub avec le PLB dans le RS est un point clé dans la formation du PPLB et conduit à la modulation de
10 l'activité de la Ca^{2+} ATPase. De ce fait, les composés qui modulent cette liaison et qui, de cette façon devraient empêcher l'inhibition de l'activité de la Ca^{2+} ATPase, auront potentiellement un effet bénéfique sur la relaxation myocardique.

15 La présente invention a pour but de fournir un nouveau procédé de détection de modulateurs de la relaxation cardiaque, ce procédé incluant l'effet modulateur, d'une molécule potentielle, sur la phosphorylation du PLB.

20 De tels modulateurs peuvent être des protéines et des petites molécules, en particulier des petites molécules.

De tels modulateurs sont des inhibiteurs et/ou des antagonistes de la déphosphorylation du PLB.

25 Ces inhibiteurs et /ou antagonistes de la déphosphorylation du PLB seraient potentiellement très utiles dans le traitement des pathologies cardiaques associées à une inhibition de la relaxation du myocarde telles que les défaillances cardiaques, les hypertrophies
30 ventriculaires gauches, les arythmies et l'insuffisance cardiaques.

Cette invention s'étend aux modulateurs, inhibiteurs et/ou antagonistes, identifiés par l'utilisation du procédé de la présente invention.

Les effets modulateurs seront estimés appropriés quand lesdits effets seront détectés ou caractérisés.

La déphosphorylation du PLB est mise en évidence, préférentiellement, par une interaction spécifique entre le PLB et la PP, ou PP1-Csub, et encore plus précisément avec le complexe PP1Csub-PP1-Tsub.

Le PLB est correctement localisé dans les vésicules de RS.

PP1-Tsub a été obtenue à partir d'un ARN messager humain codant PP1 appelé (PPP1R3). Son numéro dans Genbank est le X78578. Le clone de PP1-Tsub a été reçu déjà inséré dans le plasmide "BlueScript". La séquence de la sous-unité régulatrice associée au glycogène humain de la protéine phosphatase de type 1 a été publiée dans Diabetes 43, (10) 1234-1241 (1994).

Le PLB a été produit "in vitro" en utilisant un système de transcription/traduction particulier: le lysat de réticulocytes de lapin (Promega). Cette technique offre de nombreux avantages dont ceux d'une synthèse protéique rapide et d'un marquage de la protéine au niveau de ses méthionines (35S Met). De plus, les produits de cette synthèse "in vitro" peuvent être analysés rapidement en SDS PAGE suivi d'autoradiographie et d'immunoblots.

Du PLB marqué a pu être facilement obtenu en utilisant cette méthodologie. Le PLB a été produit, respectant sa forme multimérique native dans ce lysat et migre plus lentement. Quand on dénature le lysat par chauffage, le PLB migre au même niveau que celui contenu dans le RS contrôle purifié de chien (environ 25 kDa).

Toutes les techniques conventionnelles peuvent être utilisées pour matérialiser l'interaction entre le PLB et la PP1-Tsub, notamment l'usage des biosensors, les méthodes de liaison radioisotopiques, la scintillation de proximité, les co-immunoprécipitations,

les électrophorèses en conditions non dénaturantes, les expériences de cross linking ou couplage.

Dans un cas particulier développé dans ce procédé, de la ^{35}S -PP1-Tsub est utilisée et l'effet de
5 modulateurs potentiels a été établi en regardant l'effet de ces modulateurs potentiels sur le transfert de la protéine marquée au PLB en utilisant les méthodes radioisotopiques conventionnelles.

Un des avantages majeurs de ce nouveau procédé
10 nous est fourni par l'immobilisation des vésicules de RS, qui peuvent être ou non solubilisées.

De façon surprenante, le PLB intégré dans les vésicules ainsi immobilisées garde toutes ses capacités de liaison comme le montre son interaction toujours
15 possible avec des anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre lui. De la même façon, les anticorps polyclonaux dirigés contre la PP1-Tsub sont aussi capables de se lier aux vésicules de RS démontrant la présence de PP1-Tsub dans nos préparations ainsi
20 immobilisées.

L'immobilisation des vésicules de RS (par exemple celle des vésicules de chien) constitue une autre partie de cette invention, en utilisant de préférence des micro-cuvettes recouvertes d'une surface d'aminosilane.
25 Ces micro-cuvettes sont disponibles recouvertes de différentes surfaces telles que le carboxyméthyl-dextran ou celle d'aminosilane spécialement développée pour les grosses molécules et les cellules.

Un agent de couplage ou cross-linker tel que
30 le bis (sulfo succinimidyl) suberate (BS3, 1mM) est utilisé pour immobiliser les vésicules sur la surface d'aminosilane.

Ces vésicules sont immobilisées en utilisant une technique connue telle que celle décrite en détail
35 dans ce qui va suivre.

Les anticorps monoclonaux anti-PLB utilisés sont ceux de chez Upstate Biotechnology (ref 05-205 selon Suzuki and Wang, J Biol.chem 261:7018 1986).

De la même façon les propriétés pharmacologiques de PP1-Tsub doivent être confirmées en démontrant une interaction entre PP1-Tsub et les anticorps polyclonaux dirigés contre sa forme active.

La manière de procéder est illustrée par l'exemple suivant:

10

**Exemple: Interaction protéine-protéine:
Utilisation de la technologie des biosensors**

a) Le protocole (**FISONS Applied Sensor Technology**) utilisé pour immobiliser les vésicules est le suivant

15

1) L'activation: un niveau de base est établi avec un tampon de phosphate de sodium qui est ensuite remplacé par 200 ul d'une solution de BS3 (Pierce, 21579) pendant 10 minutes suivi d'une aspiration et de lavages successifs parfaits avec du tampon.

20

2) L'immobilisation: quand le niveau de base est atteint, 100 mg/ml de RS ont été ajoutés aux vésicules pendant 10 minutes, et ensuite lavés avec du tampon.

25

3) Saturation des sites: après immobilisation, afin de bloquer les sites restants sur la surface activée, 200 ul de serum albumine bovine (SAB, Sigma A-6003) sont ajoutés 5 minutes dans la microcuve suivi d'une aspiration et de lavages successifs parfaits avec du tampon.

30

4) Le tampon de phosphate de sodium est ensuite changé contre un tampon plus approprié, le PBS sans SAB, pour l'étape de liaison.

5) Les vésicules de SR sont alors ajoutées dans les expériences de liaison.

35

6) Une procédure de régénération de la surface est alors utilisée afin de permettre la réutilisation rapide et fréquente du ligand ainsi immobilisé.

5

b) Procédure

Des vésicules de RS de chien sont solubilisées dans une cuve par 1% de Zwittergent et immobilisées sur une surface d'aminosilane.

10 Des anticorps monoclonaux dirigés contre le PLB sont alors ajoutés. Ainsi, une interaction avec les vésicules solubilisées de RS a été mise en évidence démontrant que le PLB est toujours accessible d'un point de vue pharmacologique après immobilisation des vésicules.

15

L'association et la dissociation sont des mesures importantes de l'activité biologique ainsi que de la fonction. Le système de biosensors est un système de mesure optique pour étudier les interactions entre biomolécules en temps réel. Il permet de visualiser les réactions au moment précis où elles ont lieu, nous donnant des indications sur la dynamique mais aussi sur la force de la liaison. L'analyse se fait très rapidement sans avoir recours au marquage radioactif. L'association et la dissociation sont matérialisées par un décalage de l'angle de résonnance survenant quand un des acteurs de la réaction ou plus, libre en solution, se lie ou se détache de celui qui est immobilisé sur la surface du biosensor.

20

25 De la même façon l'anticorps anti PP1-Tsub est capable de se lier aux vésicules solubilisées de RS révélant la présence de PP1-Tsub dans nos préparations.

30

Comme contrôle négatif, des vésicules de RS de muscle squelettique sont montrées comme inactive en présence d'anticorps anti-PLB puisqu'il n'y a pas de PLB dans le muscle squelettique.

35

Quand des anticorps dirigés contre le PLB sont eux-même immobilisés sur une surface d'aminosilane, le PLB est capable de se lier à ces anticorps. L'addition de PPI-Tsub à cette étape montre clairement pour la première fois une interaction entre PPI-Tsub et PLB.

c) Résultats et Conclusion

Les résultats obtenus avec le phospholamban, la PPI-Tsub, les vésicules cardiaques de chien solubilisées sont décrits dans le tableau et montrent bien qu'une interaction existe entre le PLB et la PPI-Tsub.

	Vésicules de RS solubilisées	Anti-PLB	Anti-PPI-Tsub
PLB	++	++	--
PPI-Tsub	+++	--	++
Vésicules cardiaques de RS		+++	++
Vésicules de RS de muscle squelettique		--	+++

-- pas d' interaction,
 ++ interaction
 +++ interaction forte et haute affinité entre les deux partenaires de la réaction.

Les résultats illustrés par le tableau sont interprétés comme suit, chaque case témoignant de chaque interaction:

. PLB-vésicules de RS : liaison avec une structure du RS (probablement PPI-Tsub)

. PLB-anti-PLB : liaison entre la protéine et l'anticorps spécifique dirigé contre cette même protéine

5 . PLB-Anti PP1-Tsub : pas de reconnaissance comme prévu

. PP1-Tsub-vésicules de RS : liaison avec une structure du RS (probablement le PLB)

. PP1-Tsub -anti-PLB : pas de reconnaissance comme prévu

10 . PP1-Tsub -Anti PP1-Tsub : liaison entre la protéine et l'anticorps spécifique dirigé contre cette même protéine

15 . Vésicules de RS cardiaque-anti-PLB : liaison puisque le PLB est présent dans les vésicules de RS.

. Vésicules de RS cardiaque-anti-PP1-Tsub : liaison suggérant que PP1-Tsub est présente dans les vésicules de RS

20 . Vésicules de RS de muscle squelettique-anti-PLB : pas de reconnaissance puisque le PLB n'est pas présent dans le muscle squelettique.

. Vésicules de RS de muscle squelettique - anti-PP1-Tsub : liaison puisque PP1-Tsub est aussi présente dans le muscle squelettique.

25

Il résulte de la description qui vient d'être relatée que l'interaction entre le PLB et PP1-Tsub représente une cible potentielle pour l'action de molécules à visée thérapeutique et
30 utilisables pour les pathologies cardiovasculaires précitées.

35

Notes

Les vésicules de RS de chien ont été préparées selon Jones et al., J. Biol. Chem 1979,254,530-539.

5 Les anticorps monoclonaux de souris dirigés contre le PLB ont été obtenues chez Upstate Biotechnology (ref 05-205 selon Suzuki and Wang, J Biol Chem 261:7018 1986).

10 Les anticorps polyclonaux de mouton dirigés contre PP1-Tsub ont été obtenus de Philip Cohen (Université de Dundee).

REVENDEICATIONS

1) Procédé de détection de modulateurs de la relaxation cardiaque caractérisé en ce que l'on inclut l'effet modulateur d'une molécule potentielle, sur la phosphorylation du phospholamban (PLB).

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le phospholamban (PLB) est contenu dans les vésicules immobilisées isolées de réticulum sarcoplasmique (RS).

3) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le modulateur est un inhibiteur et/ou un antagoniste de la déphosphorylation du phospholamban.

4) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les modulateurs sont des protéines.

5) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les modulateurs sont des petites molécules.

6) Procédé selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que de la ^{35}S -PP1-Tsub est utilisée et l'effet de modulateurs potentiels est établi en regardant l'effet de ces modulateurs potentiels sur le transfert de la protéine marquée au PLB en utilisant les méthodes radioisotopiques conventionnelles.

7) Vésicules immobilisées selon la Revendication 2, isolées de réticulum sarcoplasmique (RS).

8) Vésicules immobilisées selon la revendication 7, caractérisées en ce que lesdites vésicules ont été solubilisées.

9) Vésicules immobilisées selon la revendication 7, caractérisées en ce que l'immobilisation a été effectuée sur surfaces biospécifiques telle que l'aminosilane.

10) Modulateurs inhibiteurs et/ou antagonistes identifiés selon le procédé des revendications 1 à 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)